普萘洛尔修复即刻消退产生的二次创伤*

王红波[1] 邢小莉[1] 王慧颖[2]

（[1]河南大学认知、脑与健康研究所, 教育科学学院, 河南省心理与行为研究所, 开封 475004）

（[2]河南省精神病医院, 河南省生物精神病学重点实验室, 新乡医学院第二附属医院, 新乡 453002）

摘要 恐惧消退能力的受损是创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)的标志之一。以往的研究表明, 相较于延迟消退, 恐惧获得后短时间内进行的消退训练不能形成长时程的消退记忆, 这一现象被称为即刻消退缺损。然而, 目前并不清楚这种缺损是一次性的, 还是会继续影响其后的重消退。实验 1 中, 大鼠在恐惧习得后 1 小时(即刻消退)或 24 小时(延迟消退)开始进行消退训练, 24 小时后进行重消退, 再 24 小时后进行消退记忆的测试。结果显示, 与延迟消退相比, 即刻消退效果缺损, 并引起了第二天的重消退也出现了效果缺损。实验 2 中, 恐惧获得后立即给予大鼠盐水或β-肾上腺素受体阻断剂普萘洛尔(10 mg/kg, i.p.), 然后测试即刻消退和重消退的效果。结果显示, 普萘洛尔虽没有阻止即刻消退的缺损，但避免了重消退出现缺损。总之, 严重创伤后的即刻消退不但无法有效抑制恐惧反应, 还可能造成二次创伤, 会损害恐惧消退能力, 而普萘洛尔可修复即刻消退引起的重消退缺损。这些结果将有助于我们加深对 PTSD 病理机制和早期干预后果的认识。

关键词 条件性恐惧, 即刻消退缺损, 重消退, β-肾上腺素受体阻断剂, 普萘洛尔

分类号 B845

1 引言

创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)是个体经受极端威胁生命事件后, 出现的一种精神疾病, 通常表现为恐惧, 精神紧张, 创伤事件相关的闯入性记忆, 梦魇或是其他症状(American Psychiatric Association, 2013)。2020 年新冠肺炎爆发, 我国数万人感到生命受到威胁, 其中一些人可能会因此事件而患上 PTSD。与创伤经历相关的恐惧记忆是 PTSD 的重要病理基础(Careaga et al., 2016)。条件性恐惧是目前研究恐惧习得、表达、消退

收稿日期：2020-11-09

* 教育部人文社会科学研究项目(20YJC190019), 河南省生物精神病学重点实验室开放课题(ZDSYS2019009), 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020375)资助。

通信作者：王慧颖, E-mail: wanghuiyingwing@foxmail.com

和复发的重要范式之一(Vervliet et al., 2013)。在该范式里，一个中性刺激(如声音, conditioned stimulus, CS)与厌恶性刺激(如电击, unconditioned stimulus, US)多次配对出现，个体会学习到 CS 预示着 US 的出现，形成 CS-US 的恐惧记忆。之后，单独出现的 CS 也会引发个体的恐惧反应，即条件性恐惧。如果 CS 反复出现而不再伴随 US 的强化，个体对 CS 的恐惧反应会逐渐降低，即消退(extinction)。在临床实践中，以消退为基础的暴露疗法是治疗 PTSD 的主要方法之一(Vervliet et al., 2013)。然而，消退训练后，在多种条件下，如：经过一段时间(自发恢复, spontaneous recovery)、CS 出现的情境与消退情境不同时(续新, renewal)、遭受应激性事件后(重建, reinstatement)，个体对 CS 的恐惧反应又会恢复(Vervliet et al., 2013)。这是因为消退训练仅仅使个体学习到 CS 不再预示 US 的出现，形成一种 CS-noUS 的消退记忆，与原有的恐惧记忆竞争，而不是擦除恐惧记忆。这些恐惧复发的现象表明，恐惧记忆强烈持久且易被提取，而消退记忆微弱、依赖情境且在应激条件下难被提取。所以，破坏恐惧记忆或增强消退记忆将有助于阻止恐惧复发。

记忆在刚获得时是不稳定的，经过一个巩固的过程，慢慢才变得稳定。在这个巩固时间窗里，记忆容易被行为学或药理学的方法破坏(McGaugh, 2000)。有学者指出，在恐惧记忆的巩固时间窗里进行消退学习，可能用一种新的、安全的记忆永久性地替代原有的恐惧记忆(Maren & Chang, 2006)。然而，人类和啮齿类动物研究显示，即刻消退组(创伤后 15 分钟~6 小时进行的消退)和延迟消退组(创伤后 24 小时以上才进行的消退)在消退训练中都表现出恐惧反应的逐渐降低，但在 24 小时(Merz et al., 2016; Singh et al., 2018; Stafford et al., 2013)或 48 小时(Fitzgerald et al., 2015; Giustino et al., 2017; Maren & Chang, 2006; Totty et al., 2019)后的测试中，即刻消退组的恐惧反应会恢复，显著高于延迟消退组，表明即刻消退产生的恐惧抑制效应不如延迟消退产生的持久，这一现象被称为即刻消退缺损(immediate extinction deficit, IED)(Maren, 2014)。即刻消退时，个体在消退训练过程中也表现出恐惧反应逐渐降低，并且在消退后间隔 15 分钟的测试中，恐惧反应仍保持低水平(Chang & Maren, 2009)，只是在更长时间后如 24 小时后的测试中，恐惧反应会恢复(Huff et al., 2009; Merz et al., 2016; Stafford et al., 2013; Woods & Bouton, 2008)，这表明消退记忆的巩固受到了损害。目前一致认为 IED 是由于恐惧习得过程(使用了强厌恶性刺激，如电击)引发的应激和情绪唤醒水平在即刻消退起始时仍然很高，这种高应激状态损害了消退记忆的巩固；而随着时间的推移，恐惧诱发的应激和情绪唤醒水平逐渐下降，在延迟消退起始时已较低，故消退记忆不受影响(Giustino et al., 2017; Maren, 2014; Maren & Chang, 2006; Totty et al., 2019)。

虽然以往的研究发现高应激水平下的即刻消退会出现效果缺损的现象，但并没有进一

步考察这一缺损是否会继续发生在随后的低应激水平下的重消退上。考虑到即刻消退可能被应用于创伤后的早期干预，而早期干预在临床实践中被广泛应用，并被认为是限制后续精神病理发展的有效策略(Rothbaum et al., 2014)。所以，有必要探讨严重创伤后的即刻消退只是单纯的记忆巩固受到应激的破坏而出现效果缺损，还是即刻消退本身是二次创伤事件，会持续地损害消退学习能力。由于消退能力缺损与 PTSD 症状有关，被认为是一种稳健的 PTSD 临床内表型(Giustino et al., 2016; Wicking et al., 2016)，在当今“研究领域标准(research domain criteria, RDoC)”时代下具有特殊的意义(Singewald & Holmes, 2019)。因此，我们用实验 1 进行了验证，结果显示严重创伤后的即刻消退出现效果缺损，并且第二天的重消退继续出现效果缺损，仍不能有效降低恐惧反应，但如果之前没有发生即刻消退，第二天的消退(即延迟消退组的消退 1)会显著降低恐惧反应，表明即刻消退这一操作可能是二次创伤事件，损害了消退恐惧的能力，引起之后重消退的效果不佳。

应激(如电击)会激活蓝斑去甲肾上腺素(locus coeruleus-norepinephrine, LC-NE)系统，引起 NE 大量释放(Borodovitsyna et al., 2018; McCall et al., 2015)。NE 可动态地调节条件性恐惧和消退学习，或促进或损害学习过程，这取决于不同的 NE 水平。在高 NE 水平下(如条件性恐惧学习后不久)，LC 会通过增强杏仁核功能来促进恐惧学习，并同时损害参与消退学习的前额叶的功能。在低 NE 水平下，LC 会提升前额叶抑制杏仁核的功能，促进恐惧消退(Giustino & Maren, 2018)。研究发现，强电击刺激的条件性恐惧训练后立即向大鼠腹腔(Fitzgerald et al., 2015)或基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)(Giustino et al., 2017)注射 β-肾上腺素受体阻断剂普萘洛尔(propranolol)，可以降低消退前的应激水平并挽救 IED。在弱电击刺激的条件化训练之前，采用化学遗传的方法激活 LC，会引发 IED，而往 BLA 内注射普萘洛尔可阻断这一效应(Giustino et al., 2020)。于是，在实验 1 的基础上，我们进行了实验 2，考察即刻消退前的普萘洛尔是否在挽救 IED 的同时，也阻止了即刻消退作为二次创伤对消退能力的持续破坏作用。我们发现，普萘洛尔可以阻止即刻消退对消退能力的破坏效应。这些结果将有助于我们加深对 PTSD 病理机制和早期干预效果的认识，并有助于我们在创伤暴露后合适并有效地运用干预手段，避免出现干预引起的二次创伤。

2 研究对象和方法

2.1 实验动物

雄性 Sprague-dawley(SD)大鼠(购自北京维通利华)，初始体重 240~260g，动物在 28.5 cm × 22.5 cm × 50 cm 的不锈钢笼中群居饲养，4 只/笼，自由饮水、进食。光周期为 7: 00~19: 00,

实验室温度控制在 20~22℃，相对湿度为 40%~70%。适应性饲养 7 天，期间定期抚摩捉拿动物，使其适应实验主试人员的操作，以排除非实验特异性的应激因素。本实验所有程序均得到了河南省生物精神病学重点实验室实验动物伦理委员会的批准。

2.2 实验设备

大鼠条件性恐惧训练箱及实验数据收集和分析系统(FreezeFrame Video-Based Conditioned Fear System, Coulbourn)，训练箱(30.5 cm×25.5 cm×30.5 cm)一侧侧壁安装扬声器，底部由可通电流的 18 根不锈钢管构成，扬声器和电击器均可由电脑控制，顶部安装摄像头记录动物的行为。本研究使用了两种情境，情境 A 是未经改造的条件性恐惧箱，用于条件性恐惧的训练。情境 B 在视觉、嗅觉、触觉方面都进行了改造，使之完全不同于原训练箱，用于恐惧消退。实验中同时使用 4 个训练箱。

2.3 实验程序

实验 1 随机将大鼠分成四组(8 只/组)，分别为即刻消退组(恐惧获得后 1 小时，在情境 B 中接受声音暴露)，即刻不消退组(恐惧获得后 1 小时，在情境 B 中不接受声音暴露)，延迟消退组(恐惧获得后 24 小时，在情境 B 中接受声音暴露)，延迟不消退组(恐惧获得后 24 小时，在情境 B 中不接受声音暴露)。即刻消退和延迟消退发生的时间点参考 Chang 和 Maren(2009)的研究。各组经历三个阶段：条件性恐惧的获得、消退和消退后测试，具体实验流程见图 1A。

恐惧获得：将大鼠放入条件性恐惧训练箱(情境 A)，先适应 3 分钟，然后给予 5 次声音(30s, 80dB, 2kHz)-电击(1s, 1.0mA)的匹配训练，每次间隔 1~3 分钟(平均 2 分钟)。最后一次电击后 2 分钟动物回笼。

恐惧消退：将大鼠放入情境 B 中，先适应 2 分钟，然后给予 30 次 30s 的声音条件性信号，每次间隔 1 分钟，最后一次声音信号结束后 1 分钟大鼠回笼。预实验显示 30 个 CS 试次能显著降低恐惧反应。

消退后测试：将大鼠放入测试环境中，适应 2 分钟，然后呈现 4 个连续的 CS(80dB, 2kHz)，声音信号结束后 1 分钟大鼠回笼。

实验 2 随机将大鼠分成两组(10 只/组)，即刻消退盐水组和即刻消退普萘洛尔组。除了在恐惧获得后立即向大鼠腹腔注射 10mg/kg 的盐水或普萘洛尔，这两组的恐惧获得、消退和测试的程序与实验 1 相同，具体实验流程见图 2A。剂量的选取是基于以往采用单一剂量(10mg/kg)普萘洛尔的行为学研究(Fan et al., 2011; Fitzgerald et al., 2015; Khan et al., 2018; Muravieva & Alberini, 2010; Przybyslawski et al., 1999; Robinson & Franklin, 2010; Rodriguez-Romaguera et al., 2009; Taherian et al., 2014)，显示这一剂量能显著降低恐惧水平而不影响消

退的获得、巩固和提取(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。选择在即刻消退前 1 小时给药，是因为前人关于普萘洛尔对消退记忆影响的研究结果不一致。例如，有研究报道延迟消退前 20 分钟系统注射普萘洛尔（10mg/kg）会降低消退过程中的恐惧水平但不影响消退记忆的获得、巩固和提取(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。而 Cain 等人(2004)报道延迟消退前 20 分钟皮下注射普萘洛尔（10mg/kg）增加了消退过程中的恐惧水平，以及 Fitzgerald 等人(2015)报道即刻消退前 30 分钟系统注射普萘洛尔（10mg/kg）降低恐惧水平促进消退，而延迟消退前 30 分钟注射增加恐惧水平并损害第二天消退记忆的提取。本研究旨在用普萘洛尔降低因恐惧获得训练而升高的 NE 水平，并不希望对即刻消退过程有影响，所以选择在恐惧获得后立即注射普萘洛尔(Fitzgerald et al., 2015)，但在间隔较长的 1 小时后进行即刻消退(Chang & Maren, 2009, 2011)。

2.4 测量指标

采用恐惧训练实验数据收集和分析系统自动分析动物的恐惧行为，大鼠的恐惧行为表现为"僵直" 行为(freezing behavior)，即除了呼吸之外没有任何的动作，持续时间超过 1 秒即被记录。恐惧水平指标为大鼠僵直行为时间与 CS 呈现时间的百分比。本实验的数据均使用 SPSS 24.0 进行统计分析。分别对各个阶段(恐惧获得阶段，恐惧消退阶段，恐惧测试阶段)的僵直行为进行重复方差测量分析，并采用 Bonferroni 法进行事后检验或独立与配对样本 *t* 检验对不同阶段的僵直行为的差异进行比较。

3 结果

3.1 实验 1 即刻消退引发重消退效果缺损

恐惧获得阶段(见图 1B)：重复测量方差分析显示，间隔(1h vs 24h)主效应不显著(p=0.68)，处理(是否消退)主效应不显著(p=0.64)，间隔×处理交互作用不显著(p=0.34)。试次效应显著，$F(4, 112)=52.09, p<0.001$，偏η_p^2=0.65，随着训练次数的增多，各组大鼠的恐惧水平升高。试次×间隔不显著(p=0.94)。试次×处理显著，$F(4, 112)=3.11$，p=0.02，偏η_p^2=0.10，试次×间隔×处理不显著(p=0.14)。单因素方差分析显示，各组在恐惧获得训练的最后一个试次(p=0.97)和第 2~5 个试次的均值上无差异(p=0.72)，表明各组在该阶段获得的恐惧水平无差异。

由于消退训练箱空间狭小又单调，消退阶段长达 47 分钟(30 个试次)，且在白天进行，部分大鼠随着消退试次的增加，恐惧得到消退，但其对消退环境也变得熟悉，故大鼠的探索行为减少转而进入休息甚至是睡眠行为。根据不消退的对照组大鼠的行为来看，在第 10 个消退试次时(情境 B 停留时间为 17 分钟)，大鼠的休息不动行为已经较多(见图 1B)。然而，计算

机分析软件无法区分僵直行为和睡眠行为(两者都静止不动)。因此，这里只呈现每个消退阶段的前 10 个试次，以及只比较大鼠在消退 1、消退 2 和测试阶段前 4 个 CS 恐惧水平的均值(图 1D)，以排除休息或睡眠行为的干扰。消退 1 前 4 个 CS 的均值可反映大鼠习得条件性恐惧后的恐惧表达水平，消退 2 前 4 个 CS 的均值可反映消退 1 的保持效果，而测试阶段 4 个 CS 的均值可反映消退 2 的保持效果。

恐惧消退 1 阶段(见图 1B)：重复测量方差分析显示，间隔(1h vs 24h)主效应边缘显著 $F(1, 28)=3.91$, $p=0.06$，偏$\eta_p^2=0.12$，处理(是否消退)主效应显著 $F(1, 28)=23.01$, $p<0.001$，偏$\eta_p^2=0.45$，间隔×处理交互作用不显著($p=0.74$)。试次效应显著，$F(9, 252)=1.97$, $p=0.04$，偏$\eta_p^2=0.07$。试次×间隔不显著($p=0.79$)。试次×处理显著，$F(9, 252)=3.36$, $p=0.001$，偏$\eta_p^2=0.11$，试次×间隔×处理不显著($p=0.99$)。

恐惧消退 2 阶段(见图 1B 中)：重复测量方差分析显示，间隔(1h vs 24h)主效应不显著($p=0.34$)，处理(是否消退)主效应显著，$F(1, 28)=8.06$, $p=0.01$，偏$\eta_p^2=0.22$，间隔×处理交互作用显著 $F(1, 28)=4.22$, $p=0.049$，偏$\eta_p^2=0.13$。试次效应不显著($p=0.16$)。试次×间隔显著，$F(9, 252)=2.05$, $p=0.03$，偏$\eta_p^2=0.07$。试次×处理显著 $F(9, 252)=4.55$, $p<0.001$，偏$\eta_p^2=0.14$，试次×间隔×处理不显著($p=0.48$)。

恐惧测试阶段(见图 1B)：重复测量方差分析显示，间隔(1h vs 24h)主效应显著，$F(1, 28)=5.55$, $p=0.03$，偏$\eta_p^2=0.17$。处理(是否消退)主效应显著，$F(1, 28)=7.36$, $p=0.01$，偏$\eta_p^2=0.21$，间隔×处理交互作用不显著($p=0.19$)。试次主效应显著，$F(3, 84)=4.78$, $p=0.004$，偏$\eta_p^2=0.15$。试次×间隔不显著($p=0.12$)。试次×处理不显著($p=0.57$)。试次×间隔×处理不显著($p=0.20$)。

恐惧测试阶段(见图 1C)：双因素方差分析显示，间隔(1h vs 24h)主效应显著，$F(1, 28)=5.55$, $p=0.03$，偏$\eta_p^2=0.17$，处理(是否消退)主效应显著 $F(1, 28)=7.37$, $p=0.01$，偏$\eta_p^2=0.21$，间隔×处理交互作用不显著($p=0.19$)。独立样本 t 检验显示，即刻消退组与即刻不消退组无显著差异($p=0.42$)，显著高于延迟消退组，$t(14)=3.08$, $p=0.01$, Cohen's $d=1.54$，表明出现 IED 现象。即刻不消退组和延迟不消退组差异不显著($p=0.54$)。延迟消退组显著低于延迟不消退组，$t(14)=3.54$, $p=0.01$, Cohen's $d=1.77$，表明延迟消退有效。

图 1D 显示的是即刻消退和延迟消退两组在消退 1、消退 2 和测试阶段前 4 个 CS 的均值。重复测量方差分析显示间隔(1h vs 24h)主效应显著 $F(1, 14)=6.29$, $p=0.03$，偏$\eta_p^2=0.31$。阶段(消退 1、消退 2 和测试)主效应显著 $F(2, 28)=15.50$, $p<0.001$，偏$\eta_p^2=0.53$。间隔 ×阶段交互作用不显著($p=0.10$)。单因素重复测量方差分析显示即刻消退组阶段效应不显著($p=0.19$)，即没有消退效果，表明低应激水平下的重消退的效果也受到损害。延迟消退组阶段效应显著

$F(2, 14)=29.61$, $p<0.001$, 偏$\eta_p^2=0.81$, 其中消退 1 显著高于消退 2 ($p=0.006$)和测试($p=0.001$), 消退 2 与测试间的差异边缘显著($p=0.06$), 表明延迟消退组的重消退效果也较为明显。

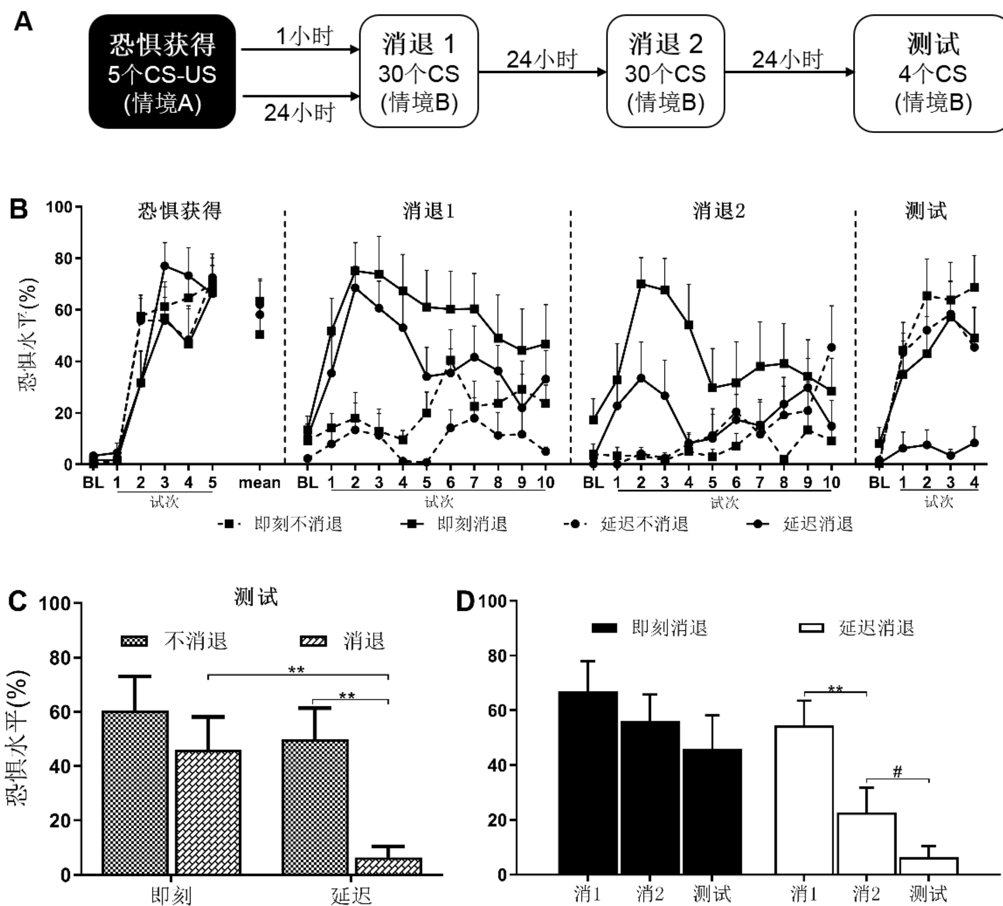


图 1 即刻消退引发重消退效果缺损

3.2 实验 2 普萘洛尔修复即刻消退引起的重消退缺损

恐惧获得阶段(见图 2B): 重复测量方差分析显示, 药物(盐水 vs 普萘洛尔)主效应不显著($p=0.96$)。试次主效应显著, $F(4, 72)=28.26$, $p<0.001$, 偏$\eta_p^2=0.61$, 随着训练次数的增多, 各组大鼠的恐惧水平升高。药物×试次交互作用不显著($p=0.81$)。

恐惧消退 1 阶段(见图 2B): 重复测量方差分析显示, 药物(盐水 vs 普萘洛尔)主效应不显著($p=0.45$)。试次主效应显著, $F(9, 162)=6.80$, $p<0.001$, 偏$\eta_p^2=0.27$, 随着消退训练次数的增多, 各组大鼠的恐惧水平逐渐降低。药物×试次交互作用不显著($p=0.99$)。

恐惧消退 2 阶段(见图 2B): 重复测量方差分析显示, 药物(盐水 vs 普萘洛尔)主效应不显著($p=0.29$)。试次主效应显著, $F(9, 162)=8.23$, $p<0.001$, 偏$\eta_p^2=0.31$, 随着消退训练次数的增多, 各组大鼠的恐惧水平逐渐降低。药物×试次交互作用不显著($p=0.24$)。

恐惧测试阶段(见图 2B): 重复测量方差分析显示, 药物(盐水 vs 普萘洛尔)主效应显著

F(1, 18)=24.64, p<0.001，偏η_p^2=0.58。试次主效应不显著(p=0.54)。药物×试次交互作用不显著(p=0.22)。

图 2C 显示的是盐水组和普萘洛尔组在消退 1、消退 2 和测试阶段前 4 个 CS 的均值。重复测量方差分析显示药物(盐水 vs 普萘洛尔)主效应边缘显著, F(1, 18)=4.00, p=0.06, 偏η_p^2=0.18, 阶段主效应显著, F(2, 36)=20.48, p<0.001, 偏η_p^2=0.53, 药物×阶段交互作用显著, F(2, 36)=3.59, p=0.04, 偏η_p^2=0.17。简单效应分析显示, 盐水组各阶段无显著差异, 与实验 1 结果一致。普萘洛尔组的消退 1 和消退 2 显著高于测试组(分别为 p<0.001 和 p=0.001), 而消退 1 和 2 无差异(p=0.11)。普萘洛尔组和盐水组在消退 1 和消退 2 阶段无差异 (分别为 p=0.45 和 p=0.27)。在测试阶段, 普萘洛尔组显著低于盐水组, F(1, 18)=11.67, p=0.003, 偏η_p^2=0.39。这些结果表明, 普萘洛尔没有阻止即刻消退出现效果缺损，但避免了第二天低应激状态下的重消退的效果受到损害。

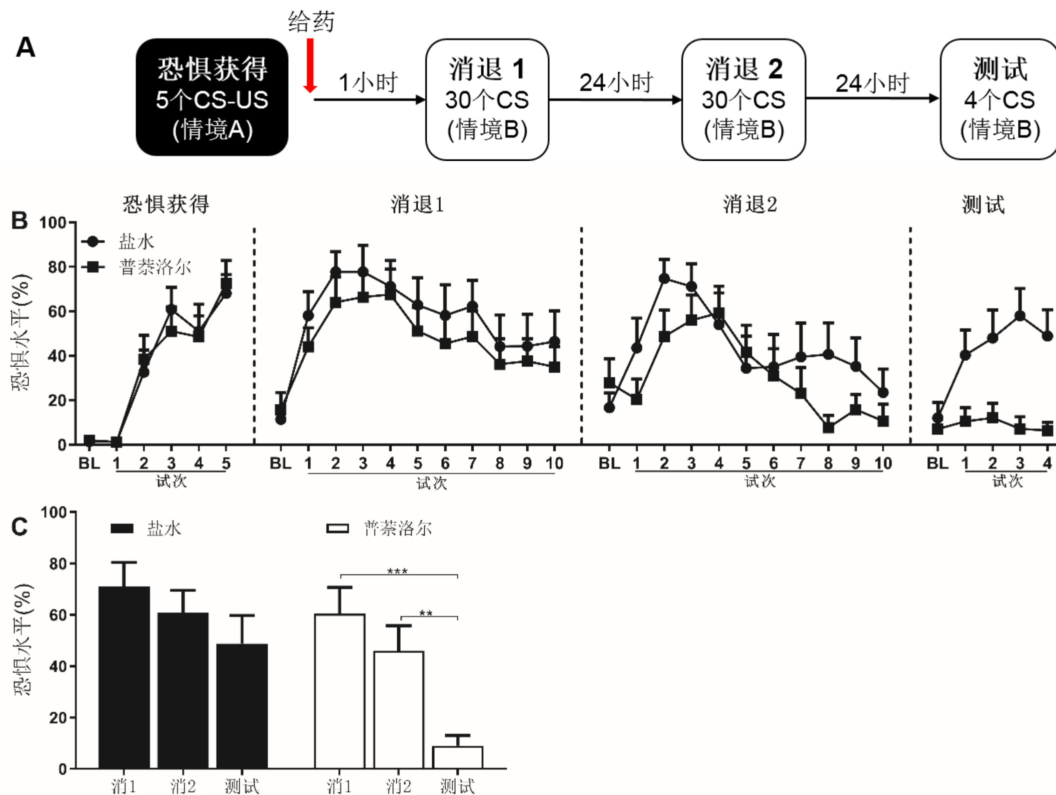


图 2 普萘洛尔修复即刻消退引发的重消退缺损

4 讨论

本研究旨在探讨严重创伤后的即刻消退效果不佳是一次性的, 还是即刻消退本身是二次创伤事件, 会损害消退学习能力, 导致重消退的效果也出现缺损。我们发现, 延迟消退组的每一次消退训练都能明显降低恐惧反应, 而即刻消退组不能形成长时程的消退记忆, 重消

退效果也受到损害。条件性恐惧习得后立即腹腔注射普萘洛尔没有阻止即刻消退缺损即 IED 现象，但避免了重消退的效果出现缺损。

实验 1 和 2 的结果显示(图 1D 和 2D)，相较于延迟消退，即刻消退表现出 IED，这与以往的研究结果一致(Fitzgerald et al., 2015; Giustino et al., 2017; Maren & Chang, 2006; Merz et al., 2016; Singh et al., 2018; Stafford et al., 2013; Totty et al., 2019)。有研究发现，内侧前额叶(medial prefrontal cortex, mPFC)的边缘下区(infralimbic, IL，对应于人类的腹内侧前额叶)在消退记忆的巩固和提取中起着核心作用(Giustino et al., 2019; Siddiqui et al., 2017; Sierra-Mercado et al., 2011)。BLA 是 mPFC 在恐惧记忆获得和消退过程中的搭档，它们相互投射，BLA 既接收来自 mPFC 的兴奋性投射也接收抑制性投射(Cho et al., 2013)。恐惧能否消退，取决于 IL-BLA 和 BLA-IL 两条投射通路上神经元的活动水平，它们是此消彼长。当 BLA 兴奋，尤其过度兴奋时，BLA-IL 投射会减弱 IL 的活动，从而损害消退记忆。强电击刺激的条件性恐惧训练会引起 IL 神经元的放电率快速且持久地降低，尤其在训练后的最初 10 分钟内，IL 神经元自发放电的损伤是最大的(Fitzgerald et al., 2015)。最近 Giustino 和同事们(2020)发现，强电击刺激的条件性恐惧训练会使大鼠 BLA 中神经元的自发性放电出现即时且急剧的增加，这一现象在恐惧训练后会持续 1 小时，其中某些神经元放电会持续更久。即刻消退正发生在这个时间，这可能是 IED 产生的原因。

如果即刻消退只是本身的记忆巩固过程受到应激的损害导致效果不佳，而不是同时作为一个创伤事件对后续的重消退产生影响，那么即刻消退组第二天的消退 2 不会出现效果缺损，因为由条件性恐惧训练引发的应激反应在第二天已降至较低水平。但本研究显示即刻消退后，第二天的重消退仍然表现出效果缺损，而之前没有发生即刻消退的第二天消退（即延迟消退组的消退 1）显著降低了 24 小时后的恐惧水平，表明即刻消退组大鼠的消退恐惧的能力受到损害，排除应激的影响，暗示即刻消退可能是二次创伤事件，加重了应激引发的不良效应。以往的研究发现，急性应激后，杏仁核被激活，机体的警觉性增强，对威胁刺激高度敏感，并且无害刺激对杏仁核的激活程度与威胁刺激相当(van Marle et al., 2009)。由于即刻消退发生在 BLA 过度兴奋期间，在此期间呈现 CS，可能会引起 BLA 对 CS 过度敏感化，形成更强的 CS-US 联结(Kyriazi et al., 2018)，以及引起 BLA 更持久的兴奋和 IL 更持久的抑制，这些都可能会导致 CS 的恐惧反应变得更难以消退，形成一种适应不良的机制(Sah, 2017; Sharp, 2017)。

在恐惧获得后立即给普萘洛尔，1 小时后进行消退 1，普萘洛尔组和盐水组的消退 1 没有差异，表明普萘洛尔没有影响恐惧的表达，而第二天消退 2 前 4 个 CS 的均值和消退 1 前 4

个 CS 的均值没有显著性差异(图 2C)，都呈现较高的恐惧水平，表明普萘洛尔也没有影响恐惧记忆的巩固和提取，这与以往的研究一致。元分析研究显示，在创伤事件后给普萘洛尔并不能破坏恐惧记忆的巩固，也不能降低 PTSD 的发生率和减轻 PTSD 症状(Argolo et al., 2015; Astill Wright et al., 2019)。所以，消退后测试中恐惧反应的降低，不能解释为普萘洛尔损害了恐惧记忆的巩固和提取。

以往的研究发现，在(恐惧获得后第二天进行)消退前 20 分钟系统注射普萘洛尔(10mg/kg)会显著降低消退过程中大鼠的恐惧水平但不影响消退记忆的获得、巩固和提取，也不能阻止之后的恐惧重建(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。这表明消退前给普萘洛尔只是急性降低了消退过程中的恐惧水平(或许是暂时地抑制了恐惧记忆的提取)，对恐惧记忆没有永久的影响，对消退记忆各阶段也没有影响。这一结论也得到了人类研究的支持(Chalkia et al., 2019)。本研究中的普萘洛尔没有显著降低消退 1 的恐惧水平，可能是因为给药的时间点和消退训练发生的时间点都与前人的研究不同。本研究是在恐惧获得后立即注射普萘洛尔，并且是 1 小时后才进行的消退训练。

值得注意的是，实验 2 的应激后普萘洛尔不能挽救 IED 的结果与 Fitzgerald 等人的研究结果不一致。Fitzgerald 等人(2015)在条件性恐惧训练结束后，立即给予大鼠普萘洛尔(同为 10mg/kg, i.p.)，发现普萘洛尔没有损害恐惧记忆的巩固但挽救了 IED。造成结果差异的原因可能有以下两点: (1) 大鼠的品系不同。Fitzgerald 等人用的是 Long–Evans 大鼠，而我们用的是 Sprague-Dawley 大鼠，不同品系的大鼠存在与训练任务相关的认知能力的差异(Gökçek-Saraç et al., 2015)和对药物敏感性的差异(Hölscher, 2002)。(2) 实验参数的设置不同。在 Fitzgerald 实验中，药物注射与消退训练间隔 30 分钟，消退 45 个试次。本研究的药物注射与消退训练间隔为 1 小时，并且消退只有 30 个试次。因此，即使普萘洛尔降低了大鼠的应激水平，但消退试次较少，消退记忆编码就较弱，就难以与恐惧记忆竞争，故消退效果不佳。同样 30 个消退试次，在低应激水平条件下的延迟消退有效，可能是由于即刻消退在时间上接近恐惧习得训练，导致恐惧记忆和消退记忆的巩固过程在时间上太过接近，消退记忆的巩固会受到恐惧记忆的前摄干扰，毕竟储存恐惧记忆更具有生存意义。另外，恐惧获得训练和消退训练在时间上接近，但仍有一段时间间隔且发生在不同的环境里，所以两者之间存在事件边界，根据 Dunsmoor 等人(2018)的理论，事件边界引导选择性巩固，优先巩固记忆中的情绪信息(恐惧记忆)——以牺牲不久后经历的相关但冲突的信息(消退记忆)为代价。虽然普萘洛尔没有挽救即刻消退受损的巩固过程，但消退后测试的恐惧水平显著低于消退 2 和盐水组，表明普萘洛尔挽救了即刻消退引发的重消退缺损。其机制可能是普萘洛尔稳定了 mPFC 的

神经活动，避免了 mPFC 的功能被即刻消退进一步损害(Fitzgerald et al., 2015)，阻止了应激诱导的 BLA 神经元放电的增加(Giustino et al., 2020)，即使此时呈现 CS，也不会引起 BLA 对 CS 的过度敏感化，所以第二天重消退产生的消退记忆可以正常获得和巩固，导致消退后测试中的恐惧反应降低。

综上所述，我们的研究证实了，严重创伤后的即刻消退是二次创伤事件，会损害消退学习能力，导致之后低应激水平下的重消退也出现效果缺损。条件性恐惧获得后系统注射的 10mg/kg 普萘洛尔不影响恐惧记忆的巩固和提取，也没有挽救即刻消退受损的巩固过程，但可以阻止高应激下的即刻消退造成二次创伤，从而使之后重消退产生的消退记忆可以正常地巩固和提取。再次证实了严重应激后不适合立即施行以消退为基础的行为干预处理。然而，本研究存在几个不足：第一，只在一个时间点注射了一个剂量的普萘洛尔，没有探究缩短给药与消退训练的时间间隔或增加剂量是否可以避免 IED 现象。第二，只探究了高应激下的即刻消退是否造成二次创伤，并没有探究高应激下的延迟消退是否也会造成二次创伤，会损害个体消退恐惧的能力。因为有研究报道，在延迟消退之前给予一次无信号的电击，引发个体的高应激和唤醒水平，个体同样出现了消退效果受损的现象(Maren & Chang, 2006)。第三，只做了 24 小时后的重消退，并没有探究间隔更长时间的重消退效果，不知道时间是否可以修复即刻消退产生的二次创伤。第四，没有探究即刻消退后，当消退能力已受损时，重消退前给普萘洛尔是否也能使消退记忆正常的获得、巩固和提取。我们将在未来探究这些内容。

参考文献

Argolo, F. C., Cavalcanti-Ribeiro, P., Netto, L. R., & Quarantini, L. C. (2015). Prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol: A meta-analytic review. *Journal of Psychosomatic Research, 79*(2), 89–93.

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*(DSM-5®). *American Psychiatric Pub*.

Astill Wright, L., Sijbrandij, M., Sinnerton, R., Lewis, C., Roberts, N. P., & Bisson, J. I. (2019). Pharmacological prevention and early treatment of post-traumatic stress disorder and acute stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry, 9*(1), 334.

Borodovitsyna, O., Joshi, N., & Chandler, D. (2018). Persistent Stress-Induced Neuroplastic Changes in the Locus Coeruleus/Norepinephrine System. *Neural Plasticity, 2018*, 1892570.

Cain, C. K., Blouin, A. M., & Barad, M. (2004). Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learning & Memory, 11*(2), 179–187.

Careaga, M B L, Girardi, C E N, & Suchecki, D. (2016). Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 71*, 48–57.

Chalkia, A., Weermeijer, J., Van Oudenhove, L., & Beckers, T. (2019). Acute but not permanent effects of propranolol on fear memory expression in humans. *Frontiers in Human Neuroscience, 13*, 51.

Chang, C. H., & Maren, S. (2009). Early extinction after fear conditioning yields a context-independent and short-

term suppression of conditional freezing in rats. *Learning & Memory, 16*(1), 62–68.

Chang, C. H., & Maren, S. (2011). Medial prefrontal cortex activation facilitates re-extinction of fear in rats. *Learning & Memory, 18*(4), 221–225.

Cho, J. H., Deisseroth, K., & Bolshakov, V. Y. (2013). Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. *Neuron, 80*(6), 1491–1507.

Dunsmoor, J. E., Kroes, M. C. W., Moscatelli, C. M., Evans, M. D., Davachi, L., & Phelps, E. A. (2018). Event segmentation protects emotional memories from competing experiences encoded close in time. *Nature Human Behaviour, 2*(4), 291–299.

Fan, S. J., Jiang, H., Yang, L. J., Liu, X., Song, J., & Pan, F. (2011). Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 193*(5), 418–424.

Fitzgerald, P. J., Giustino, T. F., Seemann, J. R., & Maren, S. (2015). Noradrenergic blockade stabilizes prefrontal activity and enables fear extinction under stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112*(28), E3729–3737.

Giustino, T. F., Fitzgerald, P. J., & Maren, S. (2016). Revisiting propranolol and PTSD: Memory erasure or extinction enhancement? *Neurobiology of Learning and Memory, 130*, 26–33.

Giustino, T. F., Fitzgerald, P. J., Ressler, R. L., & Maren, S. (2019). Locus coeruleus toggles reciprocal prefrontal firing to reinstate fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116*(17), 8570–8575.

Giustino, T. F., & Maren, S. (2018). Noradrenergic modulation of fear conditioning and extinction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, 12*, 43.

Giustino, T. F., Ramanathan, K. R., Totty, M. S., Miles, O. W., & Maren, S. (2020). Locus coeruleus norepinephrine drives stress-induced increases in basolateral amygdala firing and impairs extinction learning. *Journal of Neuroscience, 40*(4), 907–916.

Giustino, T. F., Seemann, J. R., Acca, G. M., Goode, T. D., Fitzgerald, P. J., & Maren, S. (2017). Beta-adrenoceptor blockade in the basolateral amygdala, but not the medial prefrontal cortex, rescues the immediate extinction deficit. *Neuropsychopharmacology, 42*(13), 2537–2544.

Gökçek-Saraç, Ç., Wesierska, M., & Jakubowska-Doğru, E. (2015). Comparison of spatial learning in the partially baited radial-arm maze task between commonly used rat strains: Wistar, Spargue-Dawley, Long-Evans, and outcrossed Wistar/Sprague-Dawley. *Learning & Behavior, 43*(1), 83–94.

Hölscher, C. (2002). Different strains of rats show different sensitivity to block of long-term potentiation by nitric oxide synthase inhibitors. *European Journal of Pharmacology, 457*(2-3), 99–106.

Huff, N. C., Hernandez, J. A., Blanding, N. Q., & LaBar, K. S. (2009). Delayed extinction attenuates conditioned fear renewal and spontaneous recovery in humans. *Behavioral Neuroscience, 123*(4), 834–843.

Khan, V., Sharma, S., Bhandari, U., Ali, S. M., & Haque, S. E. (2018). Raspberry ketone protects against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Life Sciences, 194*, 205–212.

Kyriazi, P., Headley, D. B., & Pare, D. (2018). Multi-dimensional coding by basolateral amygdala neurons. *Neuron, 99*(6), 1315–1328.e1315.

Maren, S. (2014). Nature and causes of the immediate extinction deficit: A brief review. *Neurobiology of Learning and Memory, 113*, 19–24.

Maren, S., & Chang, C. H. (2006). Recent fear is resistant to extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(47), 18020–18025.

McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas, M. R. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron, 87*(3),

605–620.

McGaugh, J. L. (2000). Memory - a century of consolidation. *Science, 287*(5451), 248–251.

Merz, C. J., Hamacher-Dang, T. C., & Wolf, O. T. (2016). Immediate extinction promotes the return of fear. *Neurobiology of Learning and Memory, 131*, 109–116.

Muravieva, E. V., & Alberini, C. M. (2010). Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learning & Memory, 17*(6), 306–313.

Przybyslawski, J., Roullet, P., & Sara, S. J. (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of beta adrenergic receptors. *Journal of Neuroscience, 19*(15), 6623–6628.

Robinson, M. J., & Franklin, K. B. (2010). Reconsolidation of a morphine place preference: Impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. *Behavioural Brain Research, 213*(2), 201–207.

Rodriguez-Romaguera, J., Sotres-Bayon, F., Mueller, D., & Quirk, G. J. (2009). Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biological Psychiatry, 65*(10), 887–892.

Rothbaum, B. O., Kearns, M. C., Reiser, E., Davis, J. S., Kerley, K. A., Rothbaum, A. O., . . . Ressler, K. J. (2014). Early intervention following trauma may mitigate genetic risk for PTSD in civilians: A pilot prospective emergency department study. *Journal of Clinical Psychiatry, 75*(12), 1380–1387.

Sah, P. (2017). Fear, anxiety, and the amygdala. *Neuron, 96*(1), 1–2.

Sharp, B. M. (2017). Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Translational Psychiatry, 7*(8), e1194.

Siddiqui, S. A., Singh, S., Ranjan, V., Ugale, R., Saha, S., & Prakash, A. (2017). Enhanced histone acetylation in the infralimbic prefrontal cortex is associated with fear extinction. *Cellular and Molecular Neurobiology, 37*(7), 1287–1301.

Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology, 36*(2), 529–538.

Singewald, N., & Holmes, A. (2019). Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology, 236*(1), 21–32.

Singh, S., Siddiqui, S. A., Tripathy, S., Kumar, S., Saha, S., Ugale, R., . . . Prakash, A. (2018). Decreased level of histone acetylation in the infralimbic prefrontal cortex following immediate extinction may result in deficit of extinction memory. *Brain Research Bulletin, 140*, 355–364.

Stafford, J. M., Maughan, D. K., Ilioi, E. C., & Lattal, K. M. (2013). Exposure to a fearful context during periods of memory plasticity impairs extinction via hyperactivation of frontal-amygdalar circuits. *Learning & Memory, 20*(3), 156–163.

Taherian, F., Vafaei, A. A., Vaezi, G. H., Eskandarian, S., Kashef, A., & Rashidy-Pour, A. (2014). Propranolol-induced impairment of contextual fear memory reconsolidation in rats: A similar effect on weak and strong recent and remote memories. *Basic & Clinical Neuroscience, 5*(3), 231–239.

Totty, M. S., Payne, M. R., & Maren, S. (2019). Event boundaries do not cause the immediate extinction deficit after Pavlovian fear conditioning in rats. *Scientific Reports, 9*(1), 9459.

van Marle, H. J., Hermans, E. J., Qin, S., & Fernández, G. (2009). From specificity to sensitivity: How acute stress affects amygdala processing of biologically salient stimuli. *Biological Psychiatry, 66*(7), 649–655.

Vervliet, B., Craske, M. G., & Hermans, D. (2013). Fear extinction and relapse: State of the art. *Annu Rev Clin Psychol, 9*, 215–248.

Wicking, M., Steiger, F., Nees, F., Diener, S. J., Grimm, O., Ruttorf, M., . . . Flor, H. (2016). Deficient fear extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory, 136*, 116–126.

Woods, A. M., & Bouton, M. E. (2008). Immediate extinction causes a less durable loss of performance than delayed extinction following either fear or appetitive conditioning. *Learning & Memory, 15*(12), 909–920.

Propranolol Rescued Secondary Trauma Induced by Immediate Extinction

WANG Hongbo[1, 2]; XING Xiaoli[1, 2]; WANG Huiying[3, 4]

([1] Institute of Cognition, Brain and Health, School of Educational Science, Henan University, Kaifeng 475004, China) ([2] Henan Key Lab of Psychology and Behavior, Henan University, Kaifeng 475004, China) ([3] Henan Mental Hospital, the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453002, China) ([4] Henan Key Lab of Biological Psychiatry, Henan International Joint Laboratory of Psychiatry and Neuroscience, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453002, China)

Abstract

One hallmark of posttraumatic stress disorder (PTSD) involves impairments in the ability to extinguish conditioned fear memory. Accumulating evidence suggests that extinction training that occurs shortly after fear conditioning is less effective than delayed extinction training in yielding long-term extinction memory, a phenomenon that is referred to as immediate extinction deficit (IED). However, unknown is whether the IED is just an aberration or continues to affect re-extinction.

In Experiment 1, 32 Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (Immediate-Extinction, Immediate-No Extinction, Delayed-Extinction, Delayed-No Extinction) and underwent a standard fear conditioning procedure in which they received five tone-footshock trials in chamber A. After either 1 h (immediate) or 24 h (delayed), half of the animals underwent 30 extinction trials (1st extinction session) in chamber B where the tone was presented alone. The other half remained in chamber B without any tone or footshock (these animals served as a no-extinction control group). Twenty-four hours later, these rats underwent the 2nd extinction session (re-extinction) in chamber B. Twenty-four hours after the 2nd extinction session, the rats were once again returned to chamber B and tested for their fear response to four continuous tones. The fear response was assessed by freezing behavior, and the effect of the 1st extinction session was assessed by the average freezing response across the first four trials of the 2nd extinction session. Compared with rats in the delayed

extinction group, recently conditioned rats exhibited significantly higher levels of fear in the 2nd extinction session, although an equivalent decline in freezing was observed in both groups across the 1st extinction session, suggesting that immediate extinction failed to maintain fear suppression the next day. Furthermore, after undergoing two extinction training sessions, rats in the immediate extinction group exhibited no significant reduction of freezing compared with the non-extinguished control during the retention test, suggesting that the deficit reappeared during re-extinction.

The aim of Experiment 2 was to investigate whether the deficit that was induced by immediate extinction could be rescued by the β-adrenergic receptor antagonist propranolol. In Experiment 2, 20 Sprague-Dawley rats underwent the same procedures as the immediate extinction groups in Experiment 1, with the exception that they received saline or propranolol (10 mg/kg, i.p.) within minutes after fear conditioning. We found that one injection of propranolol immediately after fear acquisition rescued the deficit of re-extinction but not immediate extinction.

This study revealed that the early extinction intervention after severe trauma may not only fail to inhibit the fear response but also act as a secondary trauma which can continually damage the ability to extinguish fear memory. Propranolol may be a good candidate to repair such damage. Our findings improve our understanding of the pathogenesis of PTSD and outcomes of an early intervention and may be helpful for selecting appropriate and effective interventions after trauma exposure and avoid secondary trauma that is caused by the intervention itself.

Key words: fear conditioning, immediate extinction deficit, re-extinction, β-noradrenergic receptor antagonist, propranolol